

(18) 日本国特許庁 (JP) (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号  
特表2002-508857  
(P2002-508857A)

(43) 公表日 平成14年3月19日 (2002.3.19)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	フ-70-1 <sup>6</sup> (参考)
G 0 2 B 21/06		G 0 2 B 21/06	
G 0 1 N 21/64		G 0 1 N 21/64	G
			E
G 0 2 B 21/10		G 0 2 B 21/10	
21/16		21/16	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 33 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平11-504682	(71) 出願人	ザ リーゼンツ オフ ザ ユニバーシ テイ オフ カリフォルニア
(22) 出願日	平成10年6月17日 (1998.6.17)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 94607
(23) 優先権主張番号	WO 98/57748	(72) 発明者	アメリカ合衆国 カリフォルニア 94555, ウォルナット クリーク, ペンザニタ コ ート 31
(24) 出願公開日	平成10年12月23日 (1998.12.23)		
(25) 優先権主張番号	08/878,145		
(26) 優先日	平成9年6月18日 (1997.6.18)		
(27) 優先権主張国	米国 (US)		
(28) 指定国	EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), CA, JP	(74) 代理人	弁護士 山本 秀策

(54) [発明の名称] 暗視野の照射のための光学的キヤビティを用いる標本照射装置および使用方法

最終頁に続く

(57) [要約]  
標本スライドホルダ、照射源、標本への光の繰り返し反  
射を達成するために配置される第1および第2反射面を  
備える標本への照射光の繰り返し反射を生成する光学的  
キヤビティを備える照射装置が提供される。装置はさら  
に、光学的キヤビティを達成するための追加的反射面、  
標本を載置するためのスライド、光学的キヤビティの反  
射構成要素であるカバースリッヅ、光学的キヤビティ内  
で光を方向づけるための1つ以上のプリズム、標本の特  
性の観察を改善するためのアンチフレーディング溶液、  
分析のための材料のプレート、蛍光構成要素、光学的キヤ  
ビティの構成要素としての湾曲反射面、標本検出装置、  
光学的検出装置、光学像の分析のためのコンピュータ、  
平面偏向器、光ファイバ、光伝送開口、顕微鏡要素、  
標本を観察するためのレンズ、および光学的キヤビティ  
一の構成要素としての標本スライドの上部および下部ミ  
ラー、装置を用いる方法もまた提供される。

[特許請求の範囲]

1. 標本を観察するための照射装置であって:

標本スライドを載置するための標本スライドホルダーであって、標本観察領域  
を有する、標本スライドホルダーと;  
照射光を提供するための光源と;

第1反射面および第2反射面を有する光学的キヤビティであって、該標本観察  
領域の一部を含む、光学的キヤビティと;

第1および第2反射面であって、該光学的キヤビティ内で照射光の繰り返し反  
射を生じるように配置され、それにより該標本観察領域の一部を照射光の繰り返し  
反射で照射する、第1および第2反射面と、  
を備える、装置。  
2. 照射光が、全反射により前記第1反射面から反射される、請求項1に記載の  
装置。

3. 前記第1反射面から反射された照射光を受容するように配置された第3反射  
面をさらに備え、ここで、前記光学的キヤビティが、該第1反射面と、前記第2  
反射面と、該第3反射面とを備え、そしてここで、該反射された照射光が、該第  
1反射面と、該第2反射面と、該第3反射面とにより繰り返し反射される、請求  
項1に記載の装置。

4. 請求項1に記載の装置であって:

前記スライドホルダー中に載置されたスライドであって、標本側と、光受容側  
と、該標本スライドの該標本受容側の上に位置した標本とを備える、スライド;  
および

前記第1反射面を含むカバースリッヅであって、該標本の一部をカバーする、  
カバースリッヅ、  
をさらに備える、装置。

5. 請求項4に記載の装置であって、該装置は、前記第2反射面と前記標本スラ  
イドの光受容側との間に位置したプリズムをさらに備え、該第2反射面は、該プ  
リズムを通過する反射照射光を反射するように位置し、該プリズムは、該反射照

射光を、該標本スライドの光受容側を透ってかつ前記カバースリッヅに向かうように方向付け、該カバースリッヅは、該反射照射光を、該プリズムを透ってかつ該第2反射面に向かうように方向付け、該第2反射面は、該反射照射光を、該プリズムを透ってかつ該カバースリッヅに向かうように方向付け、ここで、該光学的キヤビティが、該カバースリッヅと該第2反射面とを含む、装置。

6. 前記プリズムが、前記標本スライドの光受容側に載置される、請求項5に記載の装置。

7. 前記プリズムが、液浸オイルを用いて、前記標本スライドの光受容側に載置される、請求項6に記載の装置。

8. 前記プリズムと前記第2反射面とが一体化されている、請求項5に記載の装置。

9. 請求項4に記載の装置であって、前記標本側と前記カバースリッヅとの間の前記標本スライドの標本側の上に、1より大きい屈折率を有する溶液をさらに含む、装置。

10. 請求項4に記載の装置であって、前記標本スライドと前記カバースリッヅとが平面上にあり、そしてここで、該カバースリッヅにより反射されない照射光が、該カバースリッヅの平面に近い角度で該カバースリッヅを出る、装置。

11. 前記溶液が、約1.5の屈折率を有するグリセロールベースのアンチフューデインゲ溶液である、請求項8に記載の装置。

12. 請求項1に記載の装置であって、標本スライドをさらに備え、ここで、該標本スライドが、生物学的ポリマーのプレート、レア細胞 (rare cell)、および蛍光タンパク質からなる群から選択される標本を含む、装置。

13. 前記標本が、生物学的ポリマーのプレートであり、そしてここで、核酸のプレートと前記標本スライドとが一体化されている、請求項12に記載の装置。

14. 前記標本が、生物学的ポリマーのプレートであり、そして該ポリマーが、固体基質上に堆積される、請求項1に記載の装置。

15. 前記標本が、生物学的ポリマーのプレートであり、そして該ポリマーが、固体基質上で合成される、請求項1に記載の装置。

16. 前記標本が、蛍光部位を含む、請求項1に記載の装置。

17. 前記標本が、光散乱により観察される、請求項1に記載の装置。

18. 前記第2反射面が湾曲している、請求項1に記載の装置。

19. 前記第2反射面が、球面および放物面からなる群から選択される形状を有する、請求項18に記載の装置。

20. 請求項1に記載の装置であって、レンズをさらに備え、該レンズは、前記標本観察領域から集光するために載置される、装置。

21. 請求項1に記載の装置であって、レンズをさらに備え、該レンズは、前記標本観察領域から集光するために載置され、ここで、該レンズは、該標本観察領域の低倍率を提供する、装置。

22. 前記標本観察領域からの光学像を得るためのカメラをさらに備える、請求項20に記載の装置。

23. 請求項20に記載の装置であって、前記標本の光学像を得るためのカメラをさらに備え、ここで、該カメラがCCDカメラであり、そしてここで該装置が、該標本の光学像をモニターするためのデータ収集デバイスをさらに備える、装置。

24. 前記データ収集デバイスが、コンピュータを含む、請求項23に記載の装置。

25. 前記光源からの照射光が、平面偏光されている、請求項1に記載の装置。

26. 請求項1に記載の装置であって、前記光源がブーク燈であり、ここで、前記照射光が、光ファイバケーブルを用いて前記光学的キヤビティに伝送され、該ケーブルが、該ケーブルの一端にオリフィスを備え、該オリフィスが、該装置の反射面中の口径中に配置される、装置。

27. 請求項1に記載の装置であって、前記第1反射面を備える光反射側を有する標本スライドをさらに備える、装置。

28. 請求項27に記載の装置であって；

前記標本スライドの前記光反射側の一部をカバーする、カバースリッヅと；  
該標本スライド上に位置する、標本と；

該標本スライド上に載置された第1プリズムであって、前記光源からの照射光を、該標本スライドの該光反射標本側に対して方向付けるための、第1プリズムと；

該カバーリップに対する照射光の一部を繰り返し反射する、該標本スライドの光反射標本側であって、該カバーリップは、該標本スライドの該標本側の光

反射側に対する照射光を繰り返し反射し、それにより該標本を、繰り返し反射された照射光で照射する、標本スライドの光反射標本側と、  
をさらに備える、装置。

29. 前記標本が、前記標本スライドの前記光反射側の上に載置される、請求項28に記載の装置。

30. 請求項28に記載の装置であって、前記標本スライドの上に載置された第2プリズムをさらに備え、該第2プリズムは、繰り返し反射された照射光を第1ミラーに向かうように方向付け、該ミラーは、該繰り返し反射された照射光を、該第2プリズムを通して戻りかつ該標本スライドの光反射標本側に向かうように反射し、ここで、該繰り返し反射された照射光は、該標本スライドの該光反射標本側と前記カバーリップとの間で反射して、それにより該標本をさらに照射する、装置。

31. 請求項30に記載の装置であって、前記第1プリズムから、該第1プリズムを通して戻り前記標本スライドの光反射標本側に対して繰り返し反射した照射光を反射するために載置される、第2ミラーを更に備え、ここで前記繰り返し反射照射光は、該標本スライドの光反射標本側と前記カバーリップとの間で反射され、それにより該標本を更に照射し、該第2ミラーは光伝送口径を備え、前記光源から照射光を該口径を通して通過させる、装置。

32. 前記標本スライドおよび前記標本が一体化した、請求項28に記載の装置。  
33. 請求項1に記載の装置であって、前記スライドホルダに取り付けられた前記第1反射面を備える反射スライド、前記反射スライド上に配置される標本、および前記第2反射面を備えるカバーリップを更に備え、該カバーリップが前記標本の1部をカバーし、ここで前記光源からの照射光が前記カバーリップと該

反射スライドとの間で繰り返し反射される、装置。

34. 請求項1に記載の装置であって、該装置は以下、  
照射光を反射させるための第1下部ミラーであって、前記第1反射面を含み、  
該第1下部ミラーは前記標本スライドホルダの下に配置され、該第1下部ミラーが該標本ホルダへの照射光の複数経路を反射するために配置される、ミラーおよび

照射光を反射するための第1上部ミラーであって、前記第2反射面を含み、  
該第1上部ミラーが標本スライドホルダの上部に配置され、該第1上部ミラーが該標本ホルダへの照射光の複数経路を反射するために配置される、ミラー、をさらに備え、

ここで、前記光源からの該照射光が該上部および下部ミラーの間で繰り返し反射されて標本スライドホルダを照射する、装置。

35. 請求項34に記載の装置であって、前記第1上部ミラーまたは第1下部ミラーから更に照射光を繰り返し反射し更に標本を照射するために配置される第2下部ミラーおよび第2上部ミラーを更に備える、装置。

36. 標本観察領域を照射するための方法であって、以下の工程：

標本スライドを取り付けるための標本スライドホルダを提供する工程であって、  
該スライドホルダは標本観察領域を有する、工程、  
照射光を生成するための光源を提供する工程、  
第1反射面および第2反射面によって該光源から照射光を反射するための光学的キヤビティを提供する工程であって、該光学的キヤビティが、該標本観察領域の一部を含む、工程、

該光源により提供される該照射光の一部を反射するために配置される該第1反射面によって、該光学的キヤビティ内の反射照射光を提供する工程であって、  
該反射照射光が、該観察領域の一部を照射する、工程、および

該第1反射面から反射照射光を反射するために配置される該第2反射面が該光学的キヤビティ内の反射照射光の繰り返し反射のための第1反射面に相対して配置され、それにより該反射照射光の繰り返し内部反射を用いて該標本観察領域を

照射する工程、を包含する方法。

37. 請求項36に記載の方法であって；

標本側および受光側を用いて標本スライドを提供する工程であって、標本は該標本スライドの標本受光側に配置され、該標本は前記第1反射面を備えるカバー、スリッパを備える、工程、

前記第2反射面と該標本スライドの受光側との間に位置するプリズムを提供する工程、

該プリズムを通して該光源から照射光を方向づける工程であって、該プリズムは該照射光を該標本スライドの受光側を通じて前記カバースリッパ上へ方向づけ、該カバースリッパは照射光の一部を該標本スライドの標本側を通して反射させ、それにより反射照射光を生成する工程および、

該第2反射面を該プリズムを通る該反射照射光の複数経路を反射し、該プリズムが該標本スライドの受光側を通じて該反射照射光を方向づけ、それにより該標本を照射する工程、をさらに包含する方法。

38. 前記標本観察領域の一部が暗視野照射により照射される、請求項36に記載の方法。

39. 請求項36に記載の方法であって、レンズを提供する工程を更に包含し、該レンズが、前記標本観察領域内に配置される標本の光学像を得るために設置される、方法。

40. 前記標本の光学像を観察者に見せるために前記レンズの焦点を合わせる工程を更に包含する、請求項39に記載の方法。

41. 前記標本の光学像を得るためのカメラを提供し、そして該カメラを操作して該標本の光学像を得る工程を更に包含する、請求項39に記載の方法。

42. 前記標本光学像をデジタル化し、そして該デジタル化像を記録する工程を更に包含する請求項41に記載の方法。

43. 前記標本は生物学的ポリマーのアレイであって、該ポリマーのアレイに少なくとも1つのフローをハイブリダイズする工程を更に包含する、請求項39に記載の方法。

44. 前記標本は複数のアレイであり、該アレイに複数のフローをハイブリダイズする工程を更に包含する、請求項39に記載の方法。

45. 請求項36に記載の方法であって；

前記第1反射面を備える光反射標本側を用いて標本スライドを提供する工程、該標本スライドの光反射標本側の一部を覆うカバースリッパを提供する工程、

該標本スライドの光反射標本側に位置する標本を提供する工程、

該標本スライドの光反射標本側の反射に前記光源からの光を方向づけるために該標本スライドの光反射標本側に設置される第1プリズムを提供する工程、をさらに包含し、

該標本スライドの光反射標本側が、該カバースリッパに対して前記照射光の一部を繰り返して反射し、該カバースリッパが該標本スライドの標本側の光反射側に對して該照射光を繰り返して反射し、それにより該標本を、繰り返して反射された照射光で照射する方法。

46. 請求項45に記載の方法であって、前記標本スライドの光反射標本側に設置される第2プリズムを提供し、該第2プリズムは繰り返して反射した照射光を第1ミラーに対して方向づけ、該ミラーは該繰り返して反射した照射光を該第2プリズムを通して戻し、該標本スライドの光反射側に対して反射させ、該繰り返して反射した照射光は該標本スライドの光反射標本側と前記カバースリッパとの間を反射され、それにより該標本を更に照射する工程を更に包含する、方法。

47. 請求項46に記載の方法であって、前記繰り返して反射した照射光を、前記第1プリズムから該第1プリズムを通じて戻し前期標本スライドの光反射標本側に対して反射させるために取り付けた第2ミラーを提供し、該繰り返して反射した照射光が該標本スライドの光反射標本側と前記カバースリッパとの間で反射され、それにより該標本を更に照射し、該第2ミラーが光伝送口径を備え、それにより前記光源からの照射光を該口径に通過させる工程を更に包含する、方法。

48. 請求項36に記載の方法であって；

前記スライドホルダの下に配置した、照射光を反射させるための前記第1反射面を備える下部ミラーを提供し、該下部ミラーが、照射光の複数経路を前記該標



本ホルダへ反射するように配置される工程、  
前記スライドホルダの上に配置した、照射光を反射させるための前記第2反射面を備える上部ミラーを提供し、該上部ミラーが、照射光の複数経路を前記標本ホルダへ反射するように配置される工程、をさらに包含し、  
ここで前記光源からの照射光が該上部および下部ミラーにより反射され該標本スライドホルダを照射する、方法。

【発明の詳細な説明】

暗視野の照射のための光学的キャビティを用いる標本照射装置および使用方法

発明の属する分野

本発明は、標本照射装置およびその使用方法を提供する。この照射装置は、暗視野の照射における光散乱によって見る、または蛍光によって見るサンプルを照射するための、光学的キャビティを提供する。

政府の援助の記載

本発明は、エネルギー省から与えられた許可番号NIST-W-7405-ENC-48、ならびに国際健康学会から与えられた許可番号CA45919およびHDI7665の下、政府援助でなされた。政府は本発明に一定の権利を有する。

発明の背景

顕微鏡照射システムは、標本上に光を方向づけて、「明視野」または「暗視野」照射を作り出す。明視野照射がこう呼ばれるのは、標本を囲む視野を光線が通過し、そして顕微鏡の対物レンズに入ることが妨げられず、したがって標本を通過することによって減少した光線と比べると明るいためである。対照的に、「暗視野」システムにおいては、対物レンズの観察口径から外れる角度で光線を標本に向けることにより、その相対的な明るさが観察者に対して逆転する。標本を囲む標本視野を通過する光は妨げられて、顕微鏡の対物レンズを通しては見えない。しかし、標本に方向づけられた光のいくらかは散乱して、観察している対物レンズに入る。したがって、標本が周りの暗視野よりも明るくなる。

同様に、蛍光に基づく顕微鏡では、光は典型的に、観察光学系に入る照射光の量が最小となる角度で標本視野内に方向付けられる。例えば、観察者の光路とは逆の方向を向いた光学系を通過する。フィルターを用いて残っている外れた照射光および散乱光を除くことによって、観察者から見ると視野が暗くなる。蛍光試料の発蛍光団を励起させると、二次的な光を発し、標本を明るくする。典型的な応用では、照射光は標本を1回だけ通過する。

蛍光に基づく顕微鏡の使用の1つは、無機物、有機物および生物学的ポリマーの検出および定量である。蛍光を臨末的装置で分析し、免疫学、毒物学、微生物

学、薬剤スクリーニング、臨床化学、組織病理学などに関する測定値を得る。蛍光を様々な関係で分析し、酵素、アミノ酸、発癌物質、および広範囲にわたる他の化合物の研究を行う。DNAやRNAのような核酸、タンパク質、染色体および他の巨大分子構造が、蛍光に基づく顕微鏡によって全て可視化される。生物学的ポリマーのアレイを蛍光に基づく顕微鏡によってモニターし、ハイブリダイゼーションによる核酸の配列決定、遺伝的多型の決定、薬剤スクリーニング、および他の多くの利用を行う。例えば、比較ゲノムハイブリダイゼーション (CGH) は、参照ゲノムと比較したときのゲノム内で増幅または欠失された配列の存在および局在化を同定するための周知のアプローチである。Kallioniemiら、(1992) Science 258:818およびPinkelら、PCT/US95/16155(QMO 96/17958)参照。CGHにより、ゲノムの再配置にかかわらず、増幅および欠損が明らかになり、さまざまな癌に関連する増幅または欠失をモニターすることにより、例えば癌の評価および診断に用いられる。CGHは複写数(copy number)の定量的な評価を提供し得、また正常な染色体内の配列の増幅または欠損の局在化に関する情報をも提供する。

次第に有用になる、他の蛍光に基づく技術は、基質上の生物学的ポリマーの高密度のアレイ (典型的には、1平方センチメートルあたり数百から何千何万もの異なったポリマー) を提供する。これにより、何千もの異なった分子相互作用を一度にスクリーニングできる。例えば、非常に大規模な固定化ポリマーアレイ (very large scale immobilized polymer arrays) (MSPS<sup>TM</sup>アレイ) を用いて、様々な目的のために核酸の検出が行われる。Fodorら (1991) Science, 251:767-777; Sheldonら (1993) Clinical Chemistry 39(4):718-719およびKozalら (1997) Nature Medicine 2(7):753-759参照。また、PinkelらPCT/US95/16155(QMO 96/17958)も参照。これらのアレイの分析には、典型的には1から数cm<sup>2</sup>の領域をカバーする、高感度な定量蛍光測定装置が必要である。

従来の蛍光顕微鏡およびレーザー走査顕微鏡はこのような測定に適しているが、これらは結果を得るのが遅い。なぜなら、これらは一度に狭い範囲の基質しか試験しないからである。従来の顕微鏡はまた、励起光が、蛍光を標本に集めるためのレンズと同じレンズを通ることによっても制限される。これによってレンズ

に  
自己蛍光 (autofluorescence) が発し、これが弱いシグナルを観測する能力を妨げる。

本発明は、一度に広い領域を照射する装置および方法を提供し、照射光が標本を複数通過するようにし、それによってシグナル強度を増大させることによって、上記および他の課題を解決する。照射光は観察用光学系に入らず、システムの光学的「ノイズ」を最小化する。

発明の要旨

本発明は、ミラーのような光反射面および/または全反射を利用して、標本の周りに光学的キャビティを形成し、標本を観察するのに用いられる光学系に照射光が入らないような様式で、標本に強度の高い照射を提供する。本発明の利用は、暗視野顕微鏡および蛍光顕微鏡を含むが、これらに限定されない。先行技術の照射システムに対する本発明の利点は、シグナル強度が十分に増加され、高価でない、特殊でない照射源および検出器を用いてサンプルをモニターすることができることである。他の利点は、励起光が検出用光学系から排除されるので、蛍光試料の検出におけるシグナル対ノイズの比を増加させることによって、蛍光試料を暗視野で見ることができることである。さらなる利点は、比較的広い領域を一度に見ることができ、材料の大きなアレイを同時にモニターする能力を提供することである。

本発明は、標本を見るための照射装置を提供する。この装置は、標本スライドを載置するための標本スライドホルダーを有するように構成される。このスライドホルダーは、標本観察領域を有する。光源が光を光学キャビティに提供し、標本観察領域の一部を囲むようにする (標本観察領域は、観察される全ての標本から観察用光学系までの領域を含み、標本が置かれている領域をも含む)。光学的キャビティは全ての標本観察領域、または標本観察領域の大部分のみ (例えば、領域のちょうどサンプルを含む部分) を、含み得る。

光学的キャビティは反射面を有し、ここで光源からの光が繰り返し反射し、これにより標本観察領域を照射する。いくつかの好ましい実施態様では、この装置

は標本スライド、および任意で標本を有する。このスライドは、スライドホルダー内に、スライドホルダー上に、またはスライドホルダーのそばに、載置される。

スライドホルダーは任意で単なるプラットフォームであるか、あるいはより特定の構成部分 (例えば、スライド保持保護材、光を導入するため、または標本を見るためのオリフィスなど) を有し得る。

標本スライドは、標本側、光受容側、およびその標本受容側に位置した標本を有する。一群の実施態様では、スライドの標本側および光受容側は同じであり、一方他の実施態様では、光受容側および標本側がスライドの対向した側にある。標本は、例えば載置媒体およびカバースリッパを用いて、カバーされ得る。照射源からの光が、照射光がいかなる検出装置にも直接入らないような様式で、伝播する。いくらかの散乱光または周囲の光が、任意で方向付け光学系に入る；フィルターが任意で用いられ、蛍光および暗視野の実施態様のいずれにおいても、検出光学系からの望まれない光を減少させる。

いくつかの実施態様においては、カバースリッパまたはスライドからの全反射が、光学的キヤビティの形成に寄与する。任意で、カバースリッパまたはスライドの一部が反射性コーティングされる。プリズムが任意で標本スライドの標本側に、または任意で、標本と対向する側に、載置される。これらのプリズムは、光学的キヤビティを形成する反射面に対して光を方向づけるか、または標本スライドを通過するように、またはそれに沿うように、光を方向づける。

いくつかの実施態様においては、光学的キヤビティは第一反射面、第二反射面、第三 (および、任意で第四、第五、第六、またはそれ以上の) 反射面を有し、光がこれらの面によって繰り返し反射して、標本を繰り返し通過する。

ある実施態様では、プリズムが標本スライドの光受容側上に、例えば液浸油を用いて、載置される。光がプリズムに入り、標本を通過して、カバースリッパの表面で全反射する。次いで標本およびプリズムを逆に通過する。次いで光は第二反射面によって標本の方へ逆に反射し、再びカバースリッパによって反射して、再びサンプルを通過し、プリズムに入る。この光が今一度第三反射面によって標

本の方へ逆に反射し、こうしてこの順序を繰り返す。その結果、繰り返し反射した光が標本を照射する。

1つの実施態様において、本発明の装置は第1反射面を含む光反射標本側を備えるスライドを包含する。この実施態様において、装置は、標本スライドの光反

射標本側の一部を覆うカバースリッパ、および必要に応じて、標本スライドの光反射標本側に位置された標本、またはその光反射側と反対の側を包含する。反射面上に標本を置くことで、標本からの検出器に到達する蛍光の量が増加する。標本スライドの光反射標本側に載置された第1プリズムは、光源からの光を標本スライドの光反射標本側に対して方向づけ、光反射標本側はカバースリッパに対して光の一部を反射し、カバースリッパは全反射によって、標本スライドの標本側の光反射側に対して光を反射し、それによって、繰り返し反射光で標本を照射する。1つの実施態様において、第2プリズムが標本スライドの光反射標本側に載置され、これは第1ミラーに対して繰り返し反射光を方向づける。第1ミラーは、第2プリズムを逆に通して、そして標本スライドの光反射標本側に対して繰り返し反射光を反射し、ここでこの繰り返し反射光は、標本スライドの光反射標本側とカバースリッパとの間で繰り返し反射され、それによって、標本をさらに照射する。1つの特定の実施態様において、この装置は、標本スライドの光反射標本側に対して第1プリズムを逆に通る第1プリズムからの繰り返し反射光を反射するように載置された第2ミラーをさらに包含し、ここで繰り返し反射光は、標本スライドの光反射標本側とカバースリッパとの間で反射され、それによって標本をさらに照射する。第2ミラーは必要に応じて、光源からの光が口径を通過するのを可能にする光透過口径を包含する。

また、標本観察領域を照射する方法が提供される。この方法では、(例えば上で) 記載される構成要素部分のいずれかを備える装置が提供される。1つのクラスの好ましい実施態様において、本発明の方法および装置は、サンプルの暗視野照射を提供する。1つの実施態様において、この方法は観察光学の視野に実質的に入らない角度でサンプルに光を方向づけることで、サンプルの蛍光を提供する。

本発明の方法は、必要に応じて標本の光学像を観察するためにレンズの焦点を合わせる工程を含む。好ましい実施態様において、像は低倍率で観察されるが、比較的大きな像を観察する性能は提供する。任意の光学像は、必要に応じて写真撮影、デジタル記録などをされる。コンピュータが、必要に応じて、標本のデジタル画像を解析するために使用される。アレイが観察される実施態様において、この方法は、必要に応じて、核膜またはタンパク質のプロープのようなア

レイに材料をハイドライズする工程をさらに包含する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、暗視野照射または蛍光標本の照射のための光学キャビティを示す、本発明の実施態様の図である。

図2は、サンゾルの面の上下の反射面が使用される実施態様の図である。

図3は、プリズムとミラーを使用するサンゾルライドの長さに沿って光が方向づけられ、標本を通過する照射光の繰り返し通過を達成する、実施態様の図である。

#### 定義

「光学キャビティ」は、面の間で繰り返し反射を有するように光を方向づける反射面を有する反射構造のことである。通常、光学キャビティに送達される光の少なくとも大部分は、光学キャビティ内で反射される。1つの単純な例の光学キャビティは、光送達オリフィスを備えた反射内部表面を有する球である。オリフィスを通って球へ送達された光は、球内で反射される。同様に、反射面を載置した頂部および底部のような他の構造は、光学キャビティを生成するための繰り返し反射照射光に位置される。1つ以上の反射面から反射される場合、または上記の球のような連続反射面上の1つ以上の場所から反射される場合、光線は「繰り返し反射」される。

「反射面」は、面に対して方向づけられた光の相当な部分を反射する面を含む基質である。ある実施態様において、反射面が反射される（すなわち、仕上げコートされ、これは面に対して方向づけられた実質的に全ての光を反射する）。他の実施態様では、面は特定の角度の面に対して方向づけられた光だけに対して実

質的に反射する（例えば、ガラスカバースリッパは、光がある角度でカバースリッパを通過するのを可能にし、また別の角度でカバースリッパに対して送達された光を反射する）。面が、少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、しばしば少なくとも70%、一般には少なくとも80%、通常は少なくとも90%、そして必要に応じて99%程度で、あるいはそれ以上の特定の角度で面に対して方向づけられた光を、必要に応じて選択された波長で、反射する場合、反射面は「実質的に反射」である。

「標本」は、観察されるべき物質のサンゾルである。標本は、観察者が顕微鏡または写真のような光を基礎にした観察技術を用いて観察しようとするいかなる物質からも作製され得る。例は、生体高分子（染色体、リボソーム、膜などのような、RNA、DNA、脂質、もしくはタンパク質、またはそれらの組み合わせ）から作製されるもののような分子構造物、一部のまたは全体の細胞小器官または細胞、組織、器官、化学高分子もしくは生体高分子または他の物質のアレイ（例えば、アレイがスライドまたはビーズのような観察基質に結合されているところ）、トランジスタまたはトランジスタのアレイのような小さな物理的構造物などを包含する。標本は、必要に応じて、観察を容易にするカバースリッパ、観察を容易にする染料またはフenchoneインク溶液などを包含する。

「標本スライド」は、観察のための標本を載置する基板である。基板は、ガラスおよび他のケイ酸塩、プラスチック、ならびに金属を含む様々な材料から作製され得る。基板は、必要に応じて平坦である（例えば、スライドが典型的な平坦ガラス顕微鏡スライドである場合）が、他の配置（ここで、基板は溝、ウェル、窪み、壁などを含む）もまた適している。

「標本観察領域」は、標本がそこを通して観察者によって観察され得る標本に近接する空間の部分である。

「カバースリッパ」は、標本の一部（または全部）を覆う基板である。基板は、ガラスおよび他のケイ酸塩、透過性プラスチックなど含む様々な材料から作製され得る。カバースリッパは、典型的には平坦である（例えば、カバースリッパがガラスまたはプラスチックの平坦小片である場合）が、他の配置（例えば、こ



こで、基板は溝、ウエル、窪み、壁などを含む）もまた意図される。ある角度では、光はカバースリッパによって反射される。これらの実施態様では、カバースリッパは標本を取り囲む光学キャビティの一部である。

「標本ホルダー」は、標本スライドを支持するのに適した装置である。ホルダーの正確な配置は、必要に応じてスライドの形状に適合されることが理解される。スライドは、必要に応じて、正方形、長方形、円形などのような任意の規則的または不規則な幾何的形狀であるので、ホルダーは、必要に応じて特定の形状のスライドを支持するように適合される。典型的なホルダーは、スライドを

支持するためのプラットフォームを有し（これは、必要に応じて省かれるが）、および必要に応じて把持アーマチュア、カバーなどをさらに包含する。

物質の「アレイ」とは、基板上の既知の位置での一組の物質のことを言う。必要に応じて、分析を容易にするために規則的な配置（行、列、幾何学的パターンなど）に置かれるが、基板上の物質のおおよその位置が分かっている限りは、アレイは任意の配置であり得る。

「カメラ」は、光学像を記録する任意の装置である。これは、従来のスチールフィルムカメラおよびビデオフィルムカメラ、充電されて接続された装置、デジタルカメラ、記録装置に接続した光電管などを含む。

「全反射」は、光が十分に大きな角度でその面に当たる場合の、反射光のその周囲に対して、高屈折率を有する物体表面の性能のことを言う。例えば、図1は、部分的に、全反射によるカバースリッパからの光の反射によって、形成された光学キャビティを記載する。

「照射光」は、標本を照射する光のことであり、これは光源から光学キャビティに送達された励起光、および本発明の光学キャビティ内で1回以上反射された反射光を含む。

「プリズム」は、その周辺とは異なる屈折率を有する光学構成要素である。プリズムは、必要に応じてガラス、石英、水晶またはプラスチックのような材料から作製され、そして必要に応じて、プリズム部分の上（例えば、1つ以上のその表面に）に反射コーティングを有し得、光学キャビティの一部を形成し得る。

本発明の装置の特徴が、別の特徴の「上」または「下」にあることが示される場合、このことは観察光学のような観察点に関するものであり、これは標本の上または下のいずれかであると任意に解釈されることが理解される。例えば、図1の装置は、重心に対して任意の方向で（上下、側部から側部などで、平行、垂直または実際の垂直方向に対してある角度にある標本スライドをとまって）必要に応じて搭載されるが、観察光学は、標本の上であると任意に解釈され得る。

#### 発明の詳細な説明

標本による蛍光または散乱により生成された光を増加させると同時に観察レンズまたは口径からの励起光を排除するための改善された方法が望ましい。なぜな

らば、これによって、観察者に対して改善されたシグナル対ノイズ比を生じることがある。この改善されたシグナル対ノイズ比は、より少ないサンプルの定量を可能にし、そして標本の検出の自動化を単純化する。本発明は実質的に改善されたシグナル対ノイズ視覚比を提供する。詳細には、本発明は光学キャビティを備え、これは、光源からサンプルへの光を繰り返し反射し、それによってサンプルを照射するための光を実質的に増幅する。この増幅は、必要とされる光源からの光の量を減少し、これによってサンプルを照射するために、より安い光源を使用することが可能になる。同様に、広い領域の標本の効率的な照射が可能になる。

照射されるサンプルは、視覚的に観察可能な任意の物質を含み得る。詳細には、本発明は、改善された暗視野顕微鏡法および写真術（ここで標本は照射光を散乱する）ならびに改善された蛍光に基づく顕微鏡法および写真術を提供する。

本発明は、図1を考慮することにより例示され、これは標本を観察するための照射型照射装置100（これは光学キャビティ101を備える）を図示するが、当業者は代替的な配置もまた可能であり、そして等しく好ましいことをすぐに認識する。

光源103は、プリズム105を介して励起光を方向付けし、ここで励起光は標本スライド107を介して方向付けられる。任意で、プリズム105は、標本スライド107の光受容面109に載置される。載置手段としては、液浸オイル、接着など挙げられる。代替的には、標本スライド107およびプリズム105は、一体化（例えば、

ガラスまたは光学プラスチックの単一のキャスト）であり得る。スライドおよびプリズムが不変的に互いに（例えば、熱接合、単一の型での形成または接着剤の使用によって）接着されている場合、スライドおよびプリズムは一体型であるとみなされる。

励起光は、標本スライド107を介して伝わり、そして標本111を照射する。必要に応じて、例示されるように、標本111はフロンフェード溶液113およびカバーリップ115のような第1の反射面を備え、これは標本111を介して光を全反射で反射し戻す。標本111および標本スライド107は、必要に応じて一体型（例えば、ここで標本は標本スライドに（共有的または非共有的に）結合されている）である。この実施態様の例は、核酸、核酸アレイ、タンパク質、タンパク質アレイ、染色体、生物学的細胞、電気トランジスタなどの、スライド107への結合である。

同様に、本明細書中に記載される任意の標本が、必要に応じて本明細書中に記載される標本をマウントするための任意のスライドと一体化される。ポリマーを、スライドとして使用されるガラスまたはプラスチック基質に結合するための化学の多数の例が、公知であり、例えば、シラン化学は核酸および他の生体高分子をガラススライドへと結合させるのに使用され得る。例えば、Fodorら（1991）Science, 251:767-777; Sheldonら（1993）Clinical Chemistry 39(4):718-719およびKozaiら（1996）Nature Medicine 2(7):753-759 PCT特許公開番号WO90/15070および92/10092ならびにPirrungら、米国特許第5,143,854号を参照のこと。

励起光はカバーリップ115から全反射で反射され、それにより反射光となる。反射光は、標本111を介して伝達し戻されて、標本スライド107の標本側117を通過し、続いてプリズム105を通過する。プリズム105を出ると、反射光はミラー119のような第2の反射面から反射され、プリズム105および標本スライド107を介して戻される。ここで反射光はさらに標本111を照射する。反射光は再びカバーリップ115から反射され、標本スライド107およびプリズム105を介して戻され、ここで反射光はミラー121のような第3の反射面から反射されてプリズム105および標本スライド107へと戻され、ここで標本111などを照射する。

従って、照射光（すなわち、光源からの励起光および光学キャビティに反射された光の両方を含む、標本を照射する光）は、吸収されるかまたは散乱によってキャビティから逃れるかのいずれかとなるまで、標本を介して多数の通過を成し、そうでなければ光学キャビティ101から逃れる。検出光学系に入る唯一の所望されない散乱光は、カバーリップ115の表面に全反射を生じない角度であたる散乱光であり、例えば、カバーリップ115によって反射されない照射光がカバーリップの平面に近い角度でカバーリップを出る場合である。

この散乱光は、総照射光と比較して少ないことは明らかである。それゆえ、本実施態様は、標本による光散乱および標本中で励起された蛍光の観察を可能にする、両方の暗視野照射を提供する。さらに、所望されない散乱光は、必要に応じて、適切なフィルターを使用して検出光学系から除去される。

光源103は、必要に応じて励起光をミラーに方向付ける（ここで必要に応じて光源口径123中に載置される）。光源103は、任意の公知の光源（例えば、白熱電球、フーコランプまたはレーザー、あるいは一般的にはそれらの組み合わせ）であり得、そして必要に応じてさらに光ファイバーケーブルのような光を方向付ける手段を含む。あるいは、光源103は、ミラー119の後ろ側に載置された光であり得、これは口径123を通過する励起光を備える。あるいは、口径123は省略され、そして光源103はミラー119と121、ならびにプリズム105との間の光を提供する。ミラー119、121およびカバーリップ115が光学キャビティ101を形成することは明らかである。

ミラー119および121は、簡単に図示するために湾曲したミラーとして示される。好ましい実施態様において、ミラーの焦点距離はミラー間の光路の長さにはほぼ等しい。当業者は代替的な実施態様を認識し、ミラー119および121は、任意で平面、球状、放物面または楕円形であるミラーと置き換えられる。ミラー117および119は図示の目的のために別々のミラーとして示されるが、ミラーが必要に応じて単独のミラー（例えば、平面、環状、半球状または半長円状ミラー）へと組み合わせられた場合の代替的な配置もまた可能であることを、当業者は理解する。好ましい実施態様において、ミラー119および121は、単一の連続した環状ミラ

ーで置換される。他の実施態様において、ミラー119および121は、多数連結した反射面を含む。さらに他の実施態様において、さらなるミラーが、プリズムの下のミラー119および121の間に配置されて、さらなる光を収集および反射する。同様に、さらなる反射面は、必要に応じて使用されて、標本111により放出された蛍光または標本111により散乱された光は、検出光学系のセットへと方向付けられる。例えば、1つの実施態様において、ミラーは標本により放出された蛍光を検出系のほうへ方向付けし戻す。1つの実施態様において、プリズム105およびミラー119および121は、一体化された、または部分的に一体化されたプリズム-ミラー配置（例えば、ここでプリズムは内向きに向いた適切な形状のミラー表面を含む）で置換される。光源はまた、この配置において一体型に作製され得る。1つの配置において、プリズム105、ミラー119および121は、一体型環状外部ミラーを有するプリズムで置換される。環状設計に対する利点は、反射面が連続的であり、これによって反射光に対して多数の経路を提供し、これは光が光源口径123を介してキャビティから逃れないようにする。

1クラスの実施態様において、カバースリッパ115は必要に応じて省略され、例えば、乾燥している場合、サンプル111における蛍光色素は励起によって光を発する。

照射光は、記載されるように、光の繰り返し反射によって標本を照射する。示されるように、観察装置は、必要に応じてさらにサンプルを観察するための光学的または写真の成分（例えば、対物レンズ133、および必要に応じてカメラ125）を含む。当業者が認識するように、カメラ125は、必要に応じて静止フィルムカメラ（例えば、35mmカメラ）であるか、または必要に応じてビデオ、CCD、移動フィルムカメラなどである。他の適切な検出装置は、検出器（例えば、フォトチューブ類、フォトダイオード類、電荷結合デバイス、スベクトロフォトメーターなど）を含む。好ましい実施態様において、対物レンズ133は、サンプルの低倍率を提供する。本発明によって提供される標本照射に有用な増大した光のための主な使用は、サンプルの低倍率観察であると認識されており、ここで大きな領域は高強度で照射される必要がある。

スライド107は、必要に応じて、スライドを正しく固定するために適用される保護材（例えば、アーム129）を含むスライドホルダー127によって適切な位置に固定される。スライド107は、標本観察領域135を介して観察される。この実施態様において、標本観察領域135は、サンプル111から上に向かってレンズ133まで拡張する。従って、光学的キャビティ-101は、標本観察領域135（すなわち、カバースリッパ115とスライド107との間）の一部を含む。例示を簡略化するために単純なプラットフォームとして示されるが、スライドホルダー125は、必要に応じて、スライド107を正しい場所に配置するためのアーム129、光源または電源、検出光学系などを載置した底部におけるカットアウト領域、あるいはプラットフォームまたはサンプルスライドの移動のためのギア配列を含む。幾つかの実施態様では、スライドおよびスライドホルダーは一体である。

操作において、蛍光サンプルの検出は、とりわけ図1の実施態様によって提供される。ある特に好ましい実施態様において、核酸または他の生体ポリマープレートにおける蛍光シグナルの検出が提供される。当業者は、サンプルとして生物学的ポリマーのプレートを完全に作成し得、そしてこのようなプレートの製造および設計において専門とする会社は公知である。例として、Affymax, Inc. および Affymetrix, Inc.（両方とも、Santa Clara, CA）が挙げられる。例えば、比較ゲノムハイクオリティゼーションによる染色体異常の検出のための追加の好ましいプレートは、例えば、1994年12月9日にPinkleらによって出願された同時係属出願US95/08/353,018、「Comparative Fluorescence Hybridization to Nucleic Acids」という題目の代理人整理番号02307E-056100に記載され、さらにPinkleらのPCT/US95/16155(WO 96/17958)を参照せよ。

核酸プレートにおける蛍光シグナルの検出は、プレート上の多くの標的スポットの高感度画像を必要とする。必要とされる分解能は、比較的低く、従って、一度に大きな領域（.5〜1 cm<sup>2</sup>）をイメージし得る系を設計することは魅力的である。このような領域は、数百、数千またはまさに数万の個々の標的スポットを含み得、各スポットは、潜在的に非常に多数の同じタイプの個々の分子を含む。1実施態様において、標的スポットは、標準グリセロールをベースにした蛍光アブソ



エーデイング溶液中に載置された標本スライド107の表面上に配置され、カバースリッパ115で被覆される。カバースリッパは、通常、ガラスまたは石英から作製される。従って、アレイの核酸(または他のポリマー)は、約1.5の屈折率を有する環境に含まれる。操作において使用される(例えば、蛍光を回収するために)レンズ133は、カバースリッパ115を介してアレイを観察する。プリズム105(例えば、石英から作製される)は、スライド107(これもまた、必要に応じて石英から作製される)の後部に載置され、そして浸漬オイルを用いてスライドとカップリングされる。照射系103からの照射光は、プリズム105の表面上に方向付けられる。光は、スライド107および標的を介して通過し、アソチエーデイング溶液中に、そして最終的にカバースリッパ中に入る。光がカバースリッパ115と空気との間の界面にて全反射するような角度が選択される。次いで、光は、標本スライドを逆に通過し、プリズムに入り、そしてプリズムを介して通過する。ミラー119は、光を反射してプリズム105中に戻し、そして部分的にそれを集光させる。反射光は、再び、標的アレイにおいて蛍光色素を励起し、プリズムおよび反対側のミラー121を介してカバースリッパ115によって戻る全反射によって反射される。この例において、ミラー121は、口径を有し、これを介して、照射系103からの光が装

置に入る。ミラー121は、プリズム105中へ、アレイ(これによって、再びサンゾル内の蛍光色素を励起する)へ、反対側のカバースリッパ115へ、プリズム105を介して戻り、そして反対側のミラー119へと反射する。反射の過程は、光が吸収されるか、またはキャビティから逃れるまで数回繰り返され、これによって、光がアレイにおける蛍光色素を繰り返し励起する。この系における光の偏光は、必要に応じて、標本または任意の有機堆積物によって散乱される光の量を最小化するかまたは最大化する(用途に依存して)ために調節される。

第二の好ましい実施態様は、図2に例示される。光学的キャビティ201は、第1反射面203、第2反射面205および必要に応じて第3反射面207および第4反射面209から構成される。代表的に、反射面203、205、207および209は湾曲したミラーである。

光源211からの入射光は、光学口径213を介して光学的キャビティ201に入る。例示の簡略化のために、光学口径213は、反射面203内に配置されるが、任意の203、205、207または209中に配置された口径を有する同等に好ましい配置はまた、1つ以上の反射面内の口径を介して光を方向づける多重光源を有する配列として好ましいことが認識されている。

1クラスの実施態様において、光源211からの入射光は、平面偏光化される。このクラスの実施態様において、反射面207および209は、必要に応じて省略される。光学的キャビティ201の操作において、光源211からの平面偏光は、口径213を介して光学的キャビティ201に入る。入射光は、サンゾル217上に配置されるカバースリッパ215を介して通過し、そしてサンゾルスライド219を介して通過する。角度 $\alpha$ (スライド203の法線に対して測定された)は、Brewster角に調節され、実質的に全ての入射光がカバースリッパ215およびスライド219を介して通過し得る(入射光の一部は、サンゾル217によって吸収されるかまたは散乱されるか、あるいは他のプロセスに消滅されることが認識される)。Brewster角は、平面偏光が、表面から反射されることがなく特定の屈折率を有する媒体に入るか、または出る角度である。例えば、Brewsterの法則および他の光学現象への基本入門のための、Jenkins and White(1976)Fundamentals of Optics, Fourth Edition McGraw-Hill Book Company, NYを参照。

光は、カバースリッパ215およびスライド219を通過し、これらの光透過材料の屈折率に依存した角度にて、カバースリッパ215、サンゾル217およびスライド219を介して光が通過するにつれて、屈折する。スライド219を介して通過する入射光は、第2反射面205から反射され、これによってスライド219を介して通過し、サンゾル217を照射し、カバースリッパ215を通過し、そして反対側の第1反射面203で、光が再び反射される(「繰り返し反射される」となる)反射光となる。検出光学系221は、照射光(直接入射光または励起光および一緒にあってサンゾルを照射する全ての反射光であり、サンゾル217によって散乱される)または蛍光によるサンゾル217によって発光される光を検出する。

別のクラスの実施態様において、入射光は平面偏光でないか、または $\alpha$ はBrew



ster角でない。この実施態様において、幾つかの入射光は、カバースリッヅ215およびスライド219によって反射される。カバースリッヅ215、スライド219およびサンプル217から反射された光は捕らえられ、そして追加の反射面207および209によって反射され、標本217を介して戻る。従って、光学的キャビティー201は、反射面203、205、207および209によって形成される。

検出光学系221は、便宜上、標本217上に示される。しかし、当業者は、検出光学系が必要に応じて、標本217の上または下(そしてカバースリッヅ215およびスライド219の上または下)に配置されることを理解する。上記のように、検出光学系は、任意の公知のレンズ系および光学現象をモニターするための記録デバイス(カメラ、CDカメラ、フォトチューブ、フォトダイオード、顕微鏡、ビデオカメラ、およびそれらの任意の組み合わせを含むが、これらに限定されず、必要に応じて、コンピューターあるいは他の分析システムまたはデバイスとの操作可能な組み合わせにおいて)を含む。

標本217は、必要に応じて、他の標本の実施態様のための上記の方法と同様の方法で、スライド219および/またはカバースリッヅ215と統合されることが理解される。再び上のように、カバースリッヅ215は、必要に応じて、特にサンプルが液体媒体の利得なしに観察される場合に、省略される。プリズムは、必要に応じて光を方向づけるためにサンプルの上または下に配置される。

単一光源211および単一口径213について描写されたが、追加の光源および/ま

たは口径が便宜上、光学的キャビティー201における照射を増大するために使用されることが理解されるべきである。反射面203、205、207および209は、分離した湾曲ミラー表面として描写されるが、ミラー表面は必要に応じて、平面、円環状、半楕円状、半球状などであることは容易に理解される。さらに、本発明の成分の物理的配置は、特定の結果(例えば、反射光の集光、標本の均一照射など)を得るために変化する。反射面203、205、207および209は、必要に応じて、単一の反射構造(例えば、サンプルを観察するためのおよび光学的キャビティー201に光を導入するための口径を有する球状または円環状のミラー)に組み合わされる。同様に、追加の反射面は、必要に応じて、反射面203、205、207および/また

は209の間に加えられる。

スライド219は、必要に応じてアーム225を含有するスライドホルダー223によって適切な位置に固定される。スライド219は、標本観察領域227を介して観察される。この実施態様において、標本領域227は、サンプルから検出光学系までの空間を含む。示されるように、光学的キャビティー201は、標本観察領域227を含む。例示の簡略化のために、単純なプラットフォームとして示されるが、スライドホルダー223は、必要に応じて、スライド219を位置づけるためのアーム225、光源または電源、検出光学系などを載置した底部におけるカットアウト領域を含む。幾つかの実施態様において、スライドおよびスライドホルダーは統合される。

図3は、本発明の第3の実施態様を提供する。装置300は、第1反射面スライド303、第2反射面カバースリッヅ305(ここで、全反射によって反射が起こる)、第3反射面ミラー307と第4反射面ミラー309との間に配置される光学的キャビティー301を含む。湾曲したように描写されているが、ミラー307および309は、必要に応じて平面である。適切な湾曲ミラーの設計は、半球状、hemispherical、円環状などである。入射光源311からの励起光は、プリズム313を介して光学的キャビティー301に入る。プリズム313は、光が効率よくスライド303に入ることを可能にし、ここで、この光はスライド303のより低い表面からあるいはスライド303のより上の表面またはより下の表面上の反射コーティングからの全反射によって反射される。次いで、この光はカバースリッヅから全反射をし得る。スライド303とカバースリッヅ305との間で繰り返し反射が起こった後、光は、プリズム315

を介して移行し、そしてミラー307によって反射され、プリズム315を介して逆通過し、カバースリッヅ305とスライド307との間で繰り返し反射され、プリズム315を介して逆通過し、ミラー309上に達し、そして再び光学的キャビティー301を介して逆通過する。ミラー307とミラー309との間の光の移行によって誘発される反射光の繰り返し通過は、カバースリッヅ305とスライド303との間に配置される標本317を照射する。レンズ319は、標本によって発光されるかまたは散乱される光を検出する。レンズ319は、上記の他の実施態様において記載されたとおり

、散乱されたおよび/または蛍光発光した光を回収する。レンズ319は、光学シグナル(上記のものを含む)を検出するための任意の公知のデバイスの成分であり得る。レンズ319は、必要に応じて、標本の上または下に配置される。スライド317は、スライド観察領域323を有するスライドホルダー321を有する位置に固定される。この実施態様において、スライド観察領域323は、標本317からレンズ319まで拡張する。光学的キャビティー301は、スライド303からカバースリッパ305までの標本観察領域の一部を含む。光学的キャビティー301は、スライド303、カバースリッパ305ならびにミラー307および309を含む。標本317は、スライド303が透明である場合の実施態様においてはスライド303下から観察され得、標本観察領域323はまた、スライド303下にて検出器を載置した底部まで拡張し得る。

例示の簡略化のための単純なプラットフォームとして示されるが、スライドホルダー321は、必要に応じて、スライド303を配置するためのアーム、光源または電源、検出光学系などを載置した底部におけるカットアウト領域を含む。幾つかの実施態様において、スライドおよびスライドホルダーは統合される。

この実施態様の1見解において、スライド303は、全体的にまたは部分的に、反射材料(例えば、銀またはアルミニウム)から作製されるか、あるいはミラーの上塗りを含む。表面の反射性を高めることによって、検出光学系に向かって方向づけられる蛍光の量は増加される。

カメラまたは他の記録デバイス(例えば、フォトダイオードおよびデータ貯蔵デバイス)によって観察および必要に応じて記録される光学像は、必要に応じて、本明細書中の任意の実施態様において、例えば、像をデジタル化し、貯蔵し、そしてコンピュータ上で像を分析することによって、さらに処理される。種々の

市販されている周辺装置およびソフトウェアは、例えば、PC[Intel] x86またはpentium chip-適合DOS<sup>TM</sup>、OS2<sup>TM</sup>、WINDOWS<sup>TM</sup>、WINDOWS NT<sup>TM</sup>またはWINDOWS95<sup>TM</sup>をベースとする機器)、MACINTOSH<sup>TM</sup>、またはUNIXをベースとする(例えば、SUN<sup>TM</sup>作業ステーション)コンピュータを使用して、デジタル化、貯蔵およびデジタルビデオまたはデジタル光学像を分析することにおいて有用である。

1 従来の系は、標本領域から冷却された電荷結合デバイス(CCD)カメラまで、当該分野において共通の方法で、光を運搬する。CCDカメラは、図要素(画素)のアレイを含む。標本からの光は、CCD上にイメージされる。標本の領域に対応した特定の画素(例えば、生物学的ポリマーのアレイ上の個々のハイブリダイゼーション部位)は、各位置における光強度の記録を得るためにサンプリされる。多重画素が、速度を増大するために平行に処理される。

1つの好ましい実施態様において、生物物理学的ポリマーのアレイへのハイブリダイゼーションはモニターされ、そしてコンピュータを使用して記録される。当業者は、観察のための生物学的ポリマーのアレイを完全に作製し得、そしてこのようなアレイの製造および設計において専門である会社は周知である。例として、Affymax, Inc.およびAffymetrix, Inc.を含め、両方ともSanta Clara, CA, であり、そして追加のアレイは当該分野で、例えばPinkelらPCT/US095/16155(WO 96/17958)に記載される。しかし、本発明の装置および方法は、蛍光または暗視野顕微鏡技術によって観察される任意のサンプルを照射するために容易に使用されることが強調される。

従って、本明細書中の開示および記載は、意図して、以下に続くクレーム内に記載される本発明の請求の範囲の例示であるが、これらに限定されない。本明細書中に引用される全ての特許および出願は、それぞれが個々に参考として援用されることが指示されるが、全ての目的のために完全な形で引用される。

【圖 1】

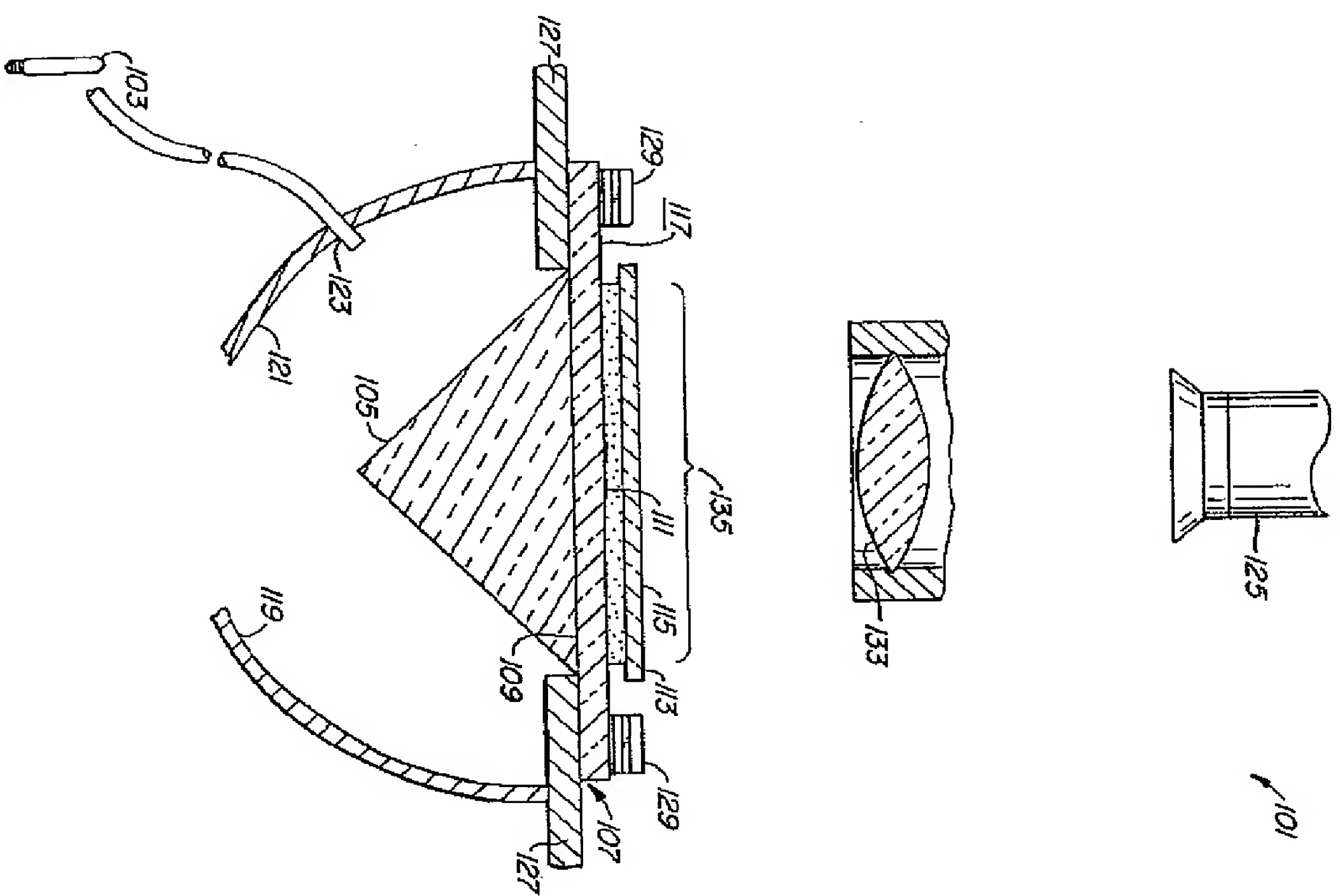
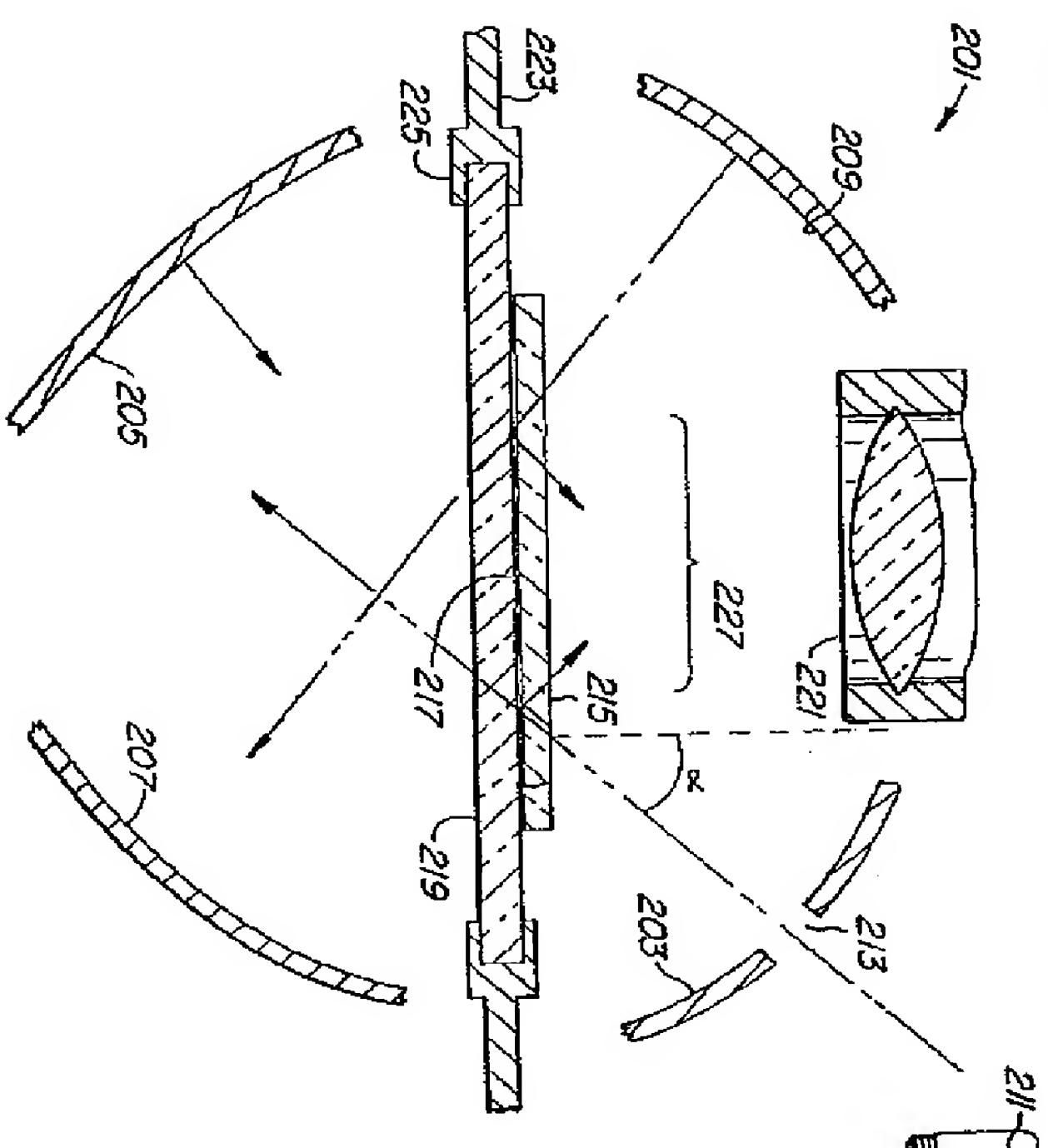


FIG. 1.

【图2】



**FIG. 2.**

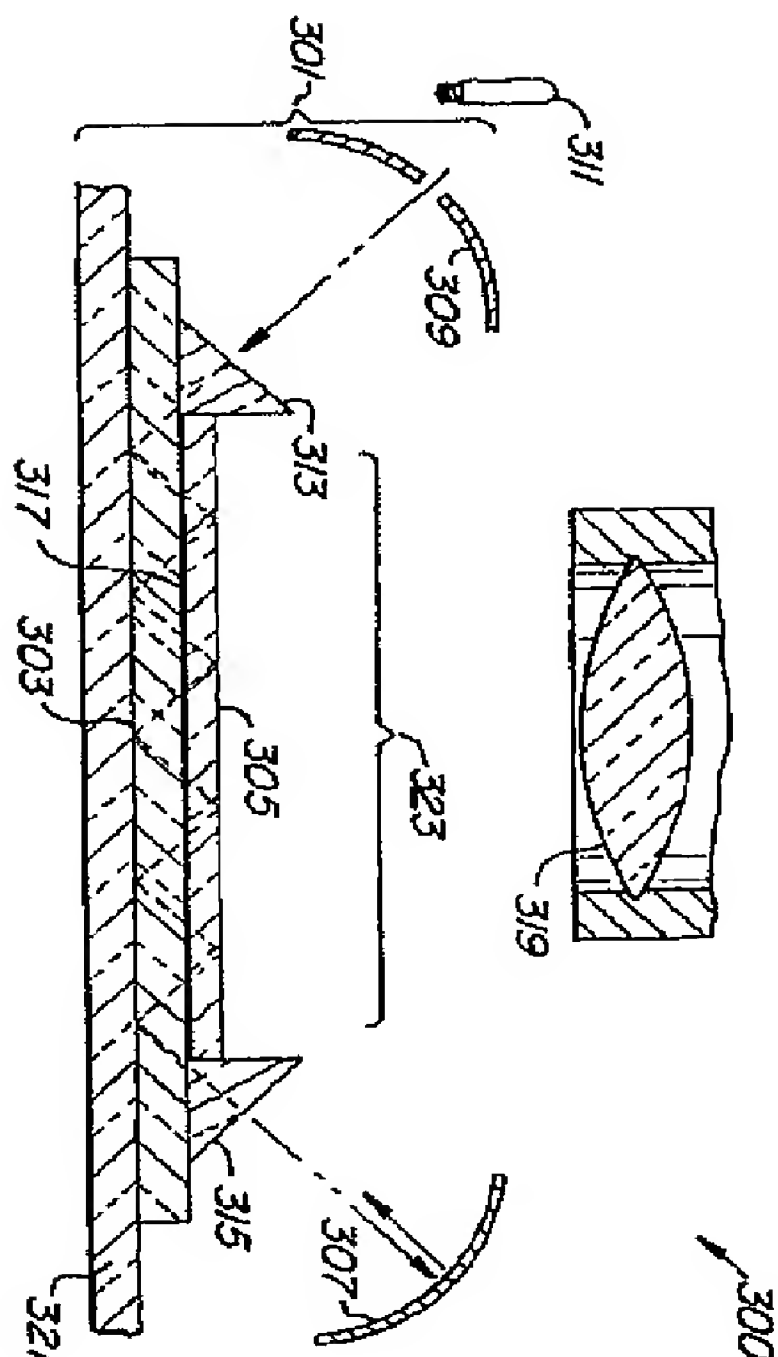


FIG. 3.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US98/12532
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(G) : B01L 9/00; C12M 1/40 US CL. : 432/104; 432/253.3 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Mandatory documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 432/104; 432/253.3		
Documentation searched other than mandatory documentation to the extent that such documents are included in the file searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS search terms: specimen holder, illumination, slide, specimen holder(P),illumination(P),slide, slide holder(P),reflect		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4,896,966 A (BOISSEAU et al.) 30 January 1990, see entire document.	1-48
Y	US 4,906,083 A (SATTLEB) 06 March 1990, see entire document.	1-48
A	US 5,315,375 A (ALLEN) 24 May 1994, see entire document.	1-48
Y	US 5,326,398 A (KEILEY et al.) 05 July 1994, see entire document.	1-48
A	US 5,417,576 A (HULL) 23 May 1995, see entire document.	1-48
Y	US 5,545,561 A (ALBERAS) 13 August 1996, see entire document.	1-48
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Book C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" documents defining the priority basis of the invention and considered to be of particular relevance "B" earlier documents published on or after the international filing date "C" documents which may have a bearing on the prior art or which are cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified) "D" document referred to in the description, claims, drawings or other parts of the application "E" document published prior to the international filing date but not taken into account in the prior art "F" document mentioned in the same patent family "G" document published after the international filing date or priority date and not in contact with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "H" document of particular relevance; the abstract invention cannot be considered without reference to the document in which it is disclosed in a later date "I" document of particular relevance; the abstract invention cannot be considered without reference to the document in which it is disclosed in a later date "J" document of particular relevance; the abstract invention cannot be considered without reference to the document in which it is disclosed in a later date "K" document of particular relevance; the abstract invention cannot be considered without reference to the document in which it is disclosed in a later date "L" document of particular relevance; the abstract invention cannot be considered without reference to the document in which it is disclosed in a later date "M" document of particular relevance; the abstract invention cannot be considered without reference to the document in which it is disclosed in a later date "N" document of particular relevance; the abstract invention cannot be considered without reference to the document in which it is disclosed in a later date "O" document of particular relevance; the abstract invention cannot be considered without reference to the document in which it is disclosed in a later date "P" document of particular relevance; the abstract invention cannot be considered without reference to the document in which it is disclosed in a later date "Q" document of particular relevance; the abstract invention cannot be considered without reference to the document in which it is disclosed in a later date "R" document of particular relevance; the abstract invention cannot be considered without reference to the document in which it is disclosed in a later date "S" document of particular relevance; the abstract invention cannot be considered without reference to the document in which it is disclosed in a later date "T" document of particular relevance; the abstract invention cannot be considered without reference to the document in which it is disclosed in a later date "U" document of particular relevance; the abstract invention cannot be considered without reference to the document in which it is disclosed in a later date "V" document of particular relevance; the abstract invention cannot be considered without reference to the document in which it is disclosed in a later date "W" document of particular relevance; the abstract invention cannot be considered without reference to the document in which it is disclosed in a later date "X" document of particular relevance; the abstract invention cannot be considered without reference to the document in which it is disclosed in a later date "Y" document of particular relevance; the abstract invention cannot be considered without reference to the document in which it is disclosed in a later date "Z" document of particular relevance; the abstract invention cannot be considered without reference to the document in which it is disclosed in a later date		
Date of the actual completion of the international search 01 AUGUST 1998		Date of mailing of the international search report 24 AUG 1998
Name and mailing address of the ISA/CIS Commissioner of Patents and Trademarks Washington, D.C. 20530 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer BRADLEY L. SISON Telephone No. (703) 308-0195 <i>Bradley L. Sison</i>



フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F 1	ノート(参考)
G 0 2 B 21/34		G 0 2 B 21/34	
(72)発明者	スター, ダミール		
	アメリカ合衆国 カリフォルニア		94618,
	オー克蘭ド, マイルズ		アベニュー ナ
	ンバー4 5321		
(72)発明者	アルバートソン, ドナ		
	アメリカ合衆国 カリフォルニア		94545,
	ラファイエット, ヒア		ローザル 1098